

**Experimentelle Versuche zur Induktion
einer spezifischen Immunität gegen TST-Antigene
transplantabler Tumoren der Ratte**

von

Wilfried Baumgärtner

aus

WeiBdorf/Ofr.

1972

1973 # 12 3

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

**Experimentelle Versuche zur Induktion
einer spezifischen Immunität gegen TST-Antigene
transplantabler Tumoren der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Wilfried Baumgärtner

aus

Weißdorf/Ofr.



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1972

Meiner Mutter
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	1
Untersuchungsgut, Versuchsanordnung	3
Versuchsablauf (Schema)	4
Blutentnahme, Serumgewinnung, CAF-Elektrophorese	5
Gewinnung des Tumorzellfiltrats	6
Gewinnung des Tumorphomogenats, BDB-Methode	7
Immunfluoreszenz	8
Sensibilisierungsplan, Transplantation	9
Verlaufskontrolle, Agargel-Diffusionstechnik (OUCHTERLONY)	10
Histologische Technik	11
Beobachtungen an den Hauptversuchstieren I	12
Beobachtungen an den Hauptversuchstieren II	13
Wachstumsverlauf der Tumoren I	15
Wachstumsverlauf der Tumoren II	21
Zusammenfassung der Beobachtungen in I und II	23
Beobachtungen in der Kontrollgruppe	24
Tumorstadium in der Kontrollgruppe	25
Überlebenszeiten der Kontrolltiere	26
Verhalten der Serumweißkörper der Versuchstiere	28
Nachweis zirkulierender, präzipitierender Antikörper bei den Versuchstieren	28
Ausgangswerte der CAF-Elektrophorese (Hauptversuchstiere)	29
Endwerte der CAF-Elektrophorese (Hauptversuchstiere)	31
Ausgangswerte der CAF-Elektrophorese (Kontrolltiere)	34
Endwerte der CAF-Elektrophorese (Kontrolltiere)	35
CAF-Elektrophorese: Statistik	36
Zusammenfassung: Nachweis präzipit. Antikörper	37
Dokumentation einiger Elektrophoresebefunde	38
Makroskopische Beurteilung von Resttumoren und Milzen	39
Mikroskopische Beurteilung von Tumoren behandelter Tiere	39
Dokumentation: Milzgrößen	40
Fotografische Dokumentation der histologischen Befunde	41
Diskussion	45
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	50

A. Einleitung

Rattentransplantable Tumoren können nach allgemeiner Übereinkunft mit den Erfahrungen der experimentellen Tumorforschung als Modell für die Verhältnisse bei Spontantumoren gelten. Bekanntlich sind Spontantumoren dadurch gekennzeichnet, daß sie vom tumortragenden Organismus offensichtlich toleriert werden. Sie unterscheiden sich hierin einwandfrei von chemisch induzierten Tumoren, bei welchen eine hochgradige Antigen-Spezifität mit dem Nachweis streng spezifischer zellulärer und im übrigen auch humoraler Antikörper gegeben ist (13, 22 a, 22 b, 30, 31, 41, 43). Sie unterscheiden sich aber auch von virusinduzierten Tumoren, welche ebenfalls eine spezifische Sensibilisierung des Trägerorganismus induzieren, in ihren antigenen Eigenschaften aber in Abhängigkeit vom jeweils verantwortlichen Virus Kreuzreaktionen aufweisen (5, 6, 15, 23 a-c, 29, 37, 39, 40, 49, 50, 52). Schließlich unterscheiden sich Spontantumoren von den kürzlich diskutierten Carcinomen, die durch Myceten hervorgerufen sein sollen, und die eine spezifische Allergie hinterlassen.

Spontantumoren besitzen jedoch nach bisherigen Erkenntnissen ebenfalls tumorspezifische Transplantationsantigene = TSTA (s. bei 1, 5), die eine klonale tumorspezifische Antikörperbildung induzieren. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen TSTA um schwache Tumor-Neoantigene, die zwar mit dem Entstehen einer ersten Tumorzelle ihre antigenen Wirkung auf den Wirtorganismus ausüben, insgesamt aber nur eine schwache Antikörperbildung bedingen. Die allmählich in Gang kommende Bildung tumorspezifischer, zellulärer Antikörper liefert somit nur ein unverhältnismäßiges Minderangebot von Abwehrsubstanz gegen das antigene Material, das durch unkontrollierte Zellteilung entstanden ist. Hinzu kommt, daß die Isoantigene und organspezi-

fischen Antigene von Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen einen relativen Antigenverlust aufweisen. Es besteht also in jedem Fall bei Spontantumoren eine Diskrepanz zwischen dem zellulären Antigenangebot und der Existenz spezifischer Transplantantikörper.

Die entscheidende Maßnahme zur Hemmung weiteren Tumorstwachstums besteht somit in der Annäherung an mengenmäßige Äquivalenz zwischen antigenem Material (Tumorzellen) und zellulären Antikörpern. Das kann entweder dadurch erfolgen, daß Antikörper z. B. in Gestalt homologer oder heterologer, spezifisch sensibilisierter Lymphozyten dem tumortragenden Organismus im Sinne der "adoptive immunity" appliziert werden, ferner dadurch, daß das antigene Material, d. h. das Tumorgewebe, so weitgehend wie möglich entfernt bzw. reduziert wird, schließlich dadurch, daß der tumortragende Organismus dauerhaft mit autologen Tumorzellpräparationen im Sinne der "Auffrischimpfung" aktiv und spezifisch stimuliert wird.

Die Übertragung spezifisch sensibilisierter Lymphozyten hat sich im Tierexperiment bereits in hohem Maße bewährt, sie ist aber mit Bezug auf die Verhältnisse in der Humanpathologie mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen belastet. Zu ihnen zählen u. a. die Induktion lymphozytenspezifischer Iso- oder Heteroantikörper, sowie die Schwierigkeit, das Immunzellmaterial optimal mit den adäquaten Oberflächenstrukturen der Tumorzelle in Kontakt zu bringen.

Den nachstehend beschriebenen Versuchen wurde die Arbeitshypothese zugrundegelegt, am Modell Walker-Carcinom-tragender Ratten durch eine Art aktiver Vorbehandlung mit verändertem Tumorzellfiltrat, eine klonale Transplantationsimmunität mit dem Ziel zu induzieren, später inokulierte Walker-Carcinom-Zellen abzustößen.

B. I. Untersuchungsgut, Versuchsanordnung und Methodik

1. Untersuchungsgut

Es wurden insgesamt 56 Albinoratten Wistar⁺, verschiedenen Geschlechts, mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 200 g in Versuch genommen. 46 Tiere dienten als Hauptversuchstiere und 10 Ratten bildeten die Kontrollgruppe.

2. Versuchsanordnung

Allen im Versuch stehenden Ratten, einschließlich der Kontrolltiere, wurde vor Behandlungsbeginn Blut entnommen. Im einzelnen wurden die Seren auf das Verhalten der Serumweißkörper mittels Elektrophorese untersucht, sowie auf tumorspezifische, präzipitierende Antikörper analysiert. Danach erfolgte bei den Tieren der Hauptversuchsgruppen eine Sensibilisierungsserie mit einem durch BDB-Technik gekoppelten Tumorzell-Transferrin-Komplex über 10 Tage, mit täglicher Applikation. Nach einem behandlungsfreien Intervall von drei Tagen wurde bei den Tieren des Hauptversuchs eine erste Blutkontrolle vorgenommen, an welche sich bei 35 Tieren (Versuchsgruppe I) und bei den nicht vorbehandelten Ratten die Übertragung eines rattentransplantablen Tumors anschloß. Von da an wurde lediglich das Tumorstadium beobachtet und nach Ermessen, bei besonders rapidem Wuchern, erneut sensibilisiert.

Bei 11 Ratten der Hauptversuchsgruppe wurde 15 Tage nach zweiter Blutentnahme (1. Kontrolle) nochmals Tumor inokuliert, da hier das Wachstum des Ersttransplantats aus ungeklärten Gründen zu gering erschien.

Eine Schlußkontrolle des Blutes, sowie die makroskopische Beurteilung der Milz und eine makroskopische und mikroskopische Betrachtung des Tumors und seines umliegenden Gewebes erfolgte kurz ante finem bzw. mit Ende der Beobachtungszeit. Detaillierte Angaben zur Versuchsanordnung s. Abb. 1.

⁺ Wistar-Ratten der Fa. Kramer, Köln

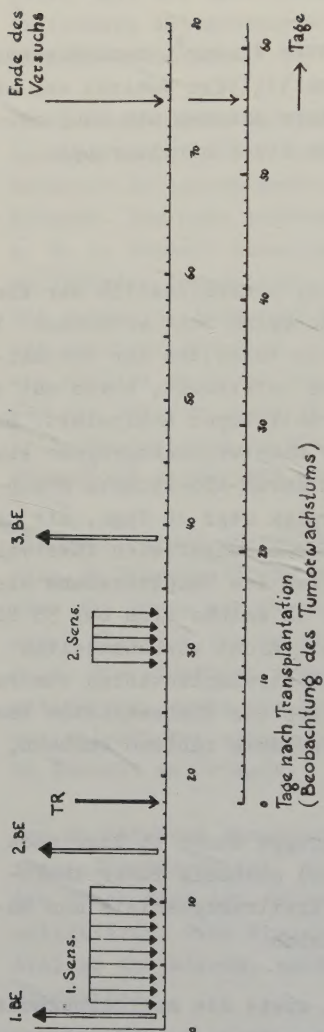
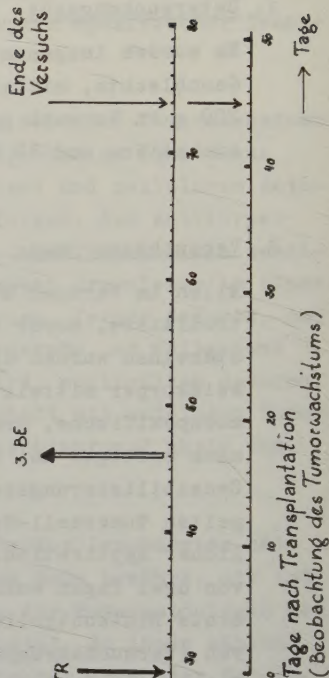


Abb. 1a und b
Versuchsabläufe in den
Hauptversuchsgruppen I und II



BE Blutentnahme
TR Transplantation
Sens Sensibilisierungsserie

3. Methodik

a) Blutentnahme und Gewinnung der Seren

Jedes Tier wurde kurzfristig mit Äther narkotisiert. Durch Kappen des Schwanzendstücks wurde aus der Schwanzvene ca. 1 ml Blut in einem Zentrifugenglas frei tropfend aufgefangen.

Das Blut verblieb zur Gerinnung und Retraktion etwa drei Stunden bei Zimmertemperatur. Danach wurde es bei 3000 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert.

b) CAF-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Serumeiweißverhältnisse wurde jedes Serum elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Arbeitsgang lagen die Angaben von KOHN (32a, b) zugrunde.

Material und Reagenzien:

- aa) Celluloseacetat-Folien (CAF) zur Kurzzeitelektrophorese⁺
- bb) Filtrierpapier
- cc) Glasplatten, Format 17 x 3 cm, fett- und staubfrei
- dd) Rattenserum
- ee) Natriumacetat-Puffer (Michaelis-Puffer), pH 8,6
Ionenstärke $\mu = 0,05$

Natrium-Diäthylbarbituricum	29,43 g
Natriumacetat-Trihydrat	19,43 g
n/10 HCl	180 ml
Aqua dest. ad	3000 ml

Dieser Puffer wird mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 verdünnt.

- ff) Färbelösung:
0,5 g Amidoschwarz 10B in 100 ml einer Lösung aus 9 Tl. Methanol und 1 Tl. Eisessig
- gg) Entfärber:
Gemisch aus 9 Tl. Methanol und 1 Tl. Eisessig
- hh) Transparenzbad⁺⁺

⁺Selecta-Elektrophoresefolien, Fa. Bender & Hobein, München

⁺⁺Fa. Bender & Hobein

Apparate und andere Laborgeräte:

- aa) Elektrophoresekammer⁺
- bb) Spannungsspeise~~ger~~ät⁺
- cc) Trockenschrank⁺
- dd) Extinktionsschreibegerät⁺⁺⁺

Arbeitsgänge:

Die CAF-Streifen wurden etwa 6 Minuten lang in o. a. Pufferlösung gewässert und nach kurzem Abtrocknen auf Filtrierpapier auf die Brücken der mit Michaelis-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer gebracht.

Kathodennah wurde auf CAF mit Hilfe einer Auftragepipette der Serumstreifen gesetzt, an die Kammerelektroden eine Spannung von 200 V angelegt und somit das Serumprotein-gemisch ca. 1 1/2 Stunden lang in Einzelfractionen auf-
getrennt.

Das Anfärben der Banden der Proteinkomponenten nach Ab-
schluß der Trennung erfolgte durch 5minütiges Einlegen
der Streifen ins Färbebad.

Überschüssige Farbe wurde in der Entfärbelösung (3 Stu-
fen, je 5 Minuten) herausgewaschen.

Danach wurden die Streifen luftblasenfrei auf Glasplatten
aufgezogen und in das Transparenzbad eingelegt, bis klare
Durchsichtigkeit erreicht war. Im Trockenschrank erfolgte
die Kurzzeittrocknung (ca. 3 bis 5 Minuten) bei 105° C.

Mit Hilfe des Extinktionsschreibers wurden die Phero-
gramme aufgezeichnet, deren Auswertung nach Planimetrie-
ren und Ermitteln der prozentualen Anteile der Eiweiß-
fraktionen mit statistischen Methoden (nach Angaben von
HASELOFF und HOFFMANN (24)) geschah.

c) Gewinnung des Tumorzellfiltrats

Das Tumorzellfiltrat wurde aus WALKER-Carcinomen gewon-
nen. Tumortragende Ratten⁺⁺⁺⁺ wurden getötet und das

⁺Fa. Bender & Hobein, München

⁺⁺⁺Fa. Carl Zeiss,
Oberkochen

⁺⁺Fa. Heraeus

Carcinom wurde unter sterilen Bedingungen aus seiner Kapsel geschält. Der Tumor wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, verbliebenes Bindegewebe und Nekrose entfernt, nach vorbereitender, grober Zerkleinerung durch die Embryonenpresse getrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:4 aufgeschwemmt. Die Zellsuspension enthielt ca. 10^{6-8} Zellen/ ml.

d) Gewinnung des Tumorphomogenats

Zur Ermittlung spezifischer, präzipitierender Antikörper gegen WALKER-Carcinom wurde das Tumorgewebe folgendermaßen aufbereitet: Der Tumor wurde von Nekrosen und Bindegewebe gesäubert, grob zerkleinert und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:4 verdünnt, sodann im Ultra-Turrax-Zerstäuber^x homogenisiert und anschließend bei 15 000 Upm 30 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf einen Eiweißgehalt von 0,5 g% eingestellt.

e) Koppelung von Tumorzellen mit Antigen

Hierzu wurde die modifizierte BDB-Technik gewählt (BDB - Bisdiazotiertes Benzidin). Im Prinzip wird dabei mittels chemischer Bindung antigene Substanz an die Oberfläche von Tumorzellen gekoppelt.

Material und Reagenzien:

- aa) Tumorzellfiltrat 2,5 %
- bb) Benzidinreagenz

0,23 g Benzidin p. a. in 45 ml 0,2 n HCl gelöst

0,1765 g NaNO₂ p. a. in 5 ml Aqua dest. gelöst

Salzsauere Benzidinlösung und Natriumnitritlösung werden zusammen 30 min bei 0° C aufbewahrt.

++++ Tumortragende Ratten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Grundmann, Fa. Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

^xFa. Janke & Künkel, Oberstaufen

- cc) Sørensen-Puffer
0,15 m Na_2HPO_4 + 0,15 m KH_2PO_4 , pH 7,4
- dd) Antigen
Human-Transferrin, standardisiert⁺

Herstellung der Injektionslösung für die Sensibilisierung

Das Tumorzellfiltrat wurde dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (Mischungsverhältnis 1:3, Zentrifugierung bei 2000 Upm über jeweils 5 min). Darauf erfolgte die Herstellung einer 2,5 %igen Tumorzell-Suspension in Sørensen-Puffer. 5 ml dieser Suspension wurden mit 200 g Transferrin-Pulver vermischt und das Gemisch mit dem Benzidin-Reagenz, das vorher 1:15 mit Sørensen-Puffer verdünnt worden war, ad 50 ml aufgefüllt. Nach 10minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die nunmehr entstandene Lösung zweimal bei 1500 Upm über je 5 min zentrifugiert. Das letzte Sediment wurde ad 350 ml Sørensen-Puffer bei Zugabe von 3,5 ml inaktivierten Kaninchenserums aufgefüllt.

Der Nachweis einer erfolgreichen Koppelung zwischen Tumorzelle und Humantransferrin ließ sich mit Hilfe fluo-reszenzoptischer Technik unter Verwendung von fluoreszeirtem Anti-Humantransferrin⁺⁺ erbringen.

f) Immunfluoreszenz

Prinzip: Zellständige Antigene und zellgebundene Antigen-Körper können mit Hilfe der von COONS 1941 angegebenen Methode der direkten Immunfluoreszenz dargestellt werden (10, 11). Dazu wird zunächst das spezifische Antiserum mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die markierten Antiseren werden auf den zu untersuchenden histologischen Schnitt oder das Ausstrichpräparat aufgebracht. Der Antigen-Antikörper-Komplex kann fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

⁺ und ⁺⁺ Fa. Behringwerke, Marburg/ Lahn

Materialien:

- | | |
|--|--------------------------|
| aa) Fluoreszenzmarkiertes Anti-Humantransferrin ⁺ | |
| bb) Kühlschrank -20° C ⁺⁺ | |
| cc) Ausstrichpräparat | ee) physiol. NaCl-Lösung |
| dd) Fluoreszenzmikroskop ⁺⁺⁺ | ff) feuchte Kammer |

Ausführung:

Die zu untersuchenden Ausstrichpräparate werden in absolutem Methanol in der Kälte fixiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt bei 37° C. Die zu untersuchenden Präparate werden mit dem markierten Antiserum für 30 min überschichtet, wobei sie, um eine Austrocknung der Antiseren zu vermeiden, in einer feuchten Kammer aufbewahrt werden müssen. Anschließend wird nicht gebundenes Antiserum durch Wässern in Küvetten mit physiologischer NaCl-Lösung unter mehrmaligem Wechsel der Lösung entfernt. Die Auswertung und Beurteilung der Präparate erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop.

g) Sensibilisierungsplan

Die Tiere der Hauptversuchsgruppen I und II wurden nach dem in Abb. 1 a und b wiedergegebenen Plan über 10 Tage hinweg täglich mit jeweils 0,5 ml obengenannter Sensibilisierungslösung subkutan injiziert. Für die Tiere der Hauptversuchsgruppe I erfolgte vom 29. bis 33. Versuchstag eine zweite Injektionsserie nach dem gleichen Modus. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt.

h) Transplantation

Allen Ratten, sowohl den Tieren der Hauptversuchsgruppen, als auch denen der Kontrollgruppe, wurden 17 bzw. 28 Tage nach Versuchsbeginn je 0,5 ml obiger Tumorzell-Suspension, d. s. ca. 5×10^7 Tumorzellen (s. unter c) subkutan injiziert. Nach 5 bis 6 Tagen konnte durch Tastbefund bzw. visuelle Kontrolle das Angehen des Tumors festgestellt werden.

⁺Fa. Behringwerke, Marburg/ Lahn ⁺⁺BBC-Gefriertruhe
⁺⁺⁺Fa. Zeiss, Oberkochen

i) Verlaufskontrolle

Die weitere Kontrolle des Tumorstwachstums erfolgte dadurch, daß nach tastbarem Angehen der Tumoren in wechselnden zeitlichen Abständen mit Hilfe eines flexiblen Maßstabes jeweils der größte Durchmesser der Geschwulst ermittelt wurde. Der zeitliche Zwischenraum zwischen zwei Messungen betrug anfangs zwei Tage; nachdem später in kurzen Abständen keine merklichen Größenänderungen mehr meßbar waren, wurden die Zeitintervalle nach Ermessen verlängert.

k) Zweidimensionale Immunodoppeldiffusion im Agargel

Zum Nachweis präzipitierender Antikörper gegen Tumorseprotein im Serum wurde die zweidimensionale Immunodoppeldiffusion im Agargel nach OUCHTERLONY (42) gewählt. Es handelt sich um die von verschiedenen Positionen aus konzentrisch erfolgende Diffusion von Antigen- und Antikörperlösung in ein immunologisch neutrales, festes Medium, wobei an den Berührungsstellen von Antigen und Antikörper ein spezifisches, unlösliches Immunpräzipitat entsteht.

Material und Reagenzien:

- aa) Objektträger
- bb) Agar-Agar (gepuffertes 1 - 1,2 %iger Agar)
- cc) Phosphat-Puffer, pH 7,1 (0,15 M)
 - Lösung I: 26,70 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.
 - Lösung II: 20,41 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua dest.
 - 67 ml der Lösung I ad 100 ml mit Lösung II gemischt

- dd) Antigen-Lösung: Tumor-Homogenat
Humantransferrin-Lösung
Tumorzelle-Transferrin-Komplex
- ee) Antikörper-Lösung: Rattenserum

In drei Analysensätzen wurde das Rattenserum jeweils gegen die drei obengenannten Antigen-Lösungen ausgetestet.

- ff) Filtrierpapier

Laborgeräte und Apparate:

- aa) Feuchte Kammer⁺
- bb) Trockenschrank⁺

⁺Fa. Heraeus

Arbeitsgänge:

Aufbereitung des gepufferten Agar, Gießen der Agarschicht und Ansetzen der für die Analysen vorgesehenen Lösungen geschah nach Vorschrift.

Nach Einfüllen von Antigen- und Antikörperlösung (randvoll) in die mit Hilfe von Schablonen in die Agarschicht eingestanzten Rosetten, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer eingebracht. Vorhandene Präzipitationslinien konnten nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur gemäß ihrer Zahl, Intensität und Form beurteilt werden.

1) Anfertigung der histologischen Schnitte von Resttumoren

Histologische Schnitte von Resttumoren und peritumoralem Gewebe wurden in herkömmlicher Weise (8) in HE-Färbung hergestellt; Schnittdicke 4μ .

Die Technik und Beurteilung übernahm freundlicherweise Herr Prof. Dr. E. Müller (Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg), dem ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen und herzlichen Dank ausspreche.

II. Ergebnisse

1. Beobachtungen an den Versuchstieren

a) Versuchsgruppe I:

Bei den 35 Tieren, die nach einer 1. Sensibilisierungsserie von 10 Tagen und darauffolgendem 7tägigen, behandlungsfreien Intervall transplantiert wurden, konnte in 33 Fällen nach etwa 4 bis 6 Tagen ein Tumor in der Größenordnung eines Kirschkerns bemerkt werden. Lediglich bei zwei Tieren blieb das Wachstum aus. Nach anfänglich raschem Wachstum der Geschwülste wurde in 30 Fällen durchschnittlich zwischen dem 10. und 15. Tag nach Transplantation ein Stillstand des Tumorstwachstums erreicht. 3 Tiere mit Tumor starben vor dieser Zeit, so daß bei ihnen keine weiteren Aussagen möglich sind. (s. auch Abb. 3 i, k, l).

Nach nochmaliger Sensibilisierung über 5 Tage (Beginn am 11. und Ende am 15. Tag nach Transplantation) bildeten sich die Tumoren bei 25 Tieren sukzessive zurück, und zwar in Form eines relativ langsam ablaufenden Einschmelzungsprozesses (Abb. 2 a, b). Bei zwei Tieren waren bis zum Ende der Beobachtungszeit Resttumoren verblieben.

Nach Überschreiten der Wachstumshöhepunkte und meßbarer Verkleinerung der Geschwülste bei den mit Erfolg sensibilisierten Ratten, ließ sich in den meisten Fällen in charakteristischer Weise eine konstante Tumorgroße über längere Zeit feststellen. Darauf folgte in der Regel binnen kurzem eine spontane Exulzeration des Tumors (Die Meßkurven zeigen gegen Versuchsende zu ein plötzliches Abknicken). Die verbliebene Wunde heilte nach wenigen Tagen vollständig ab.

Drei Ratten zeigten keinen Sensibilisierungserfolg, d. h.

das Carcinom wuchs bei ihnen kontinuierlich, bis es zum Exitus der Tiere vor Versuchsende kam (Abb. 3 a, c, d).

b) Versuchsgruppe II

Diese Gruppe von 11 Tieren wurde ebenfalls 10 Tage lang sensibilisiert, mit Tumorzellfiltrat aber erst nach einer Wartezeit von 18 Tagen nach Beendigung der Injektionsserie inokuliert. Eine zweite Sensibilisierungsreihe entfiel. Im Unterschied zur 1. Versuchsgruppe war die Latenzzeit von der Transplantation bis zu einer vergleichbaren, erstmals meßbaren Erfassung der Tumorgroße nahezu doppelt so lang, etwa 8 bis 10 Tage.

In 4 Fällen war eine Erfolgstransplantation ausgeblieben. Bei zwei Tieren ist eine Aussage über das Tumorstadium nicht möglich, da sie zu früh starben. Eine Ratte zeigte keinen Sensibilisierungserfolg, kontinuierliches Tumorstadium führte zum Exitus vor Versuchsende. Bei den verbliebenen 4 Tieren ergab sich eine relativ langsame Zunahme der Tumorgroße, ein zeitlich wesentlich verzögerter Höhepunkt des Wachstums gegenüber der 1. Gruppe, sowie langsame, stetige Abnahme des Tumordurchmessers bis zum Abbruch der Beobachtungszeit. Zwei Resttumoren verblieben, zwei Carcinome kamen völlig zum Verschwinden (Abb. 4 a, b, c und Tab 1).

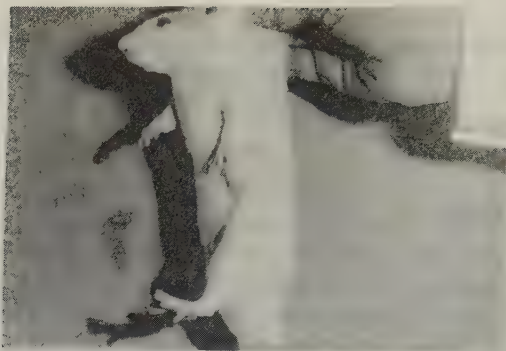


Abb. 2 a

Ein Tier der Hauptversuchsgruppe, etwa
z. Zt. beginnender Tumoreinschmelzung



Abb. 2 b

Versuchstier von Abb. 2 a am Ende
der Beobachtungszeit

Abb. 3 a bis 1

Darstellung des Tumorwachstums
in der Hauptversuchsgruppe I

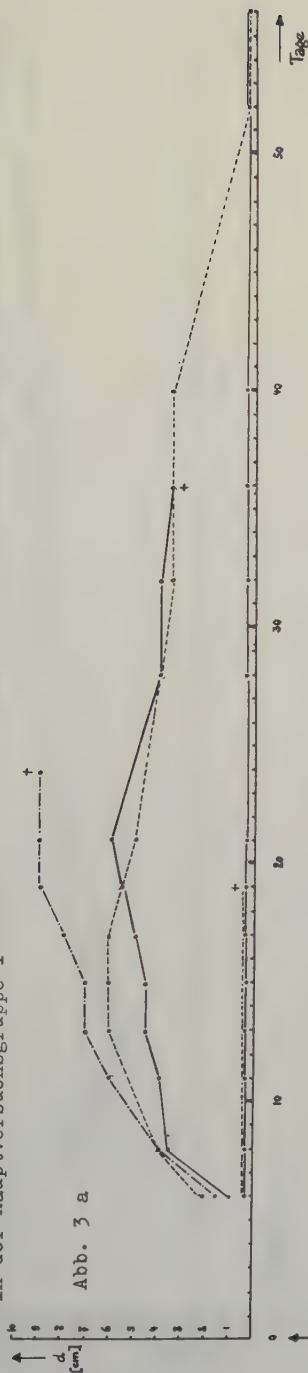
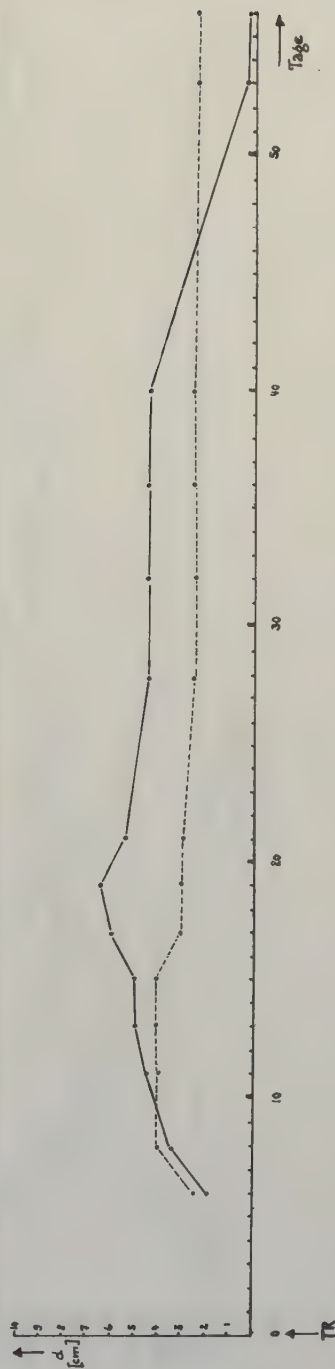


Abb. 3 b



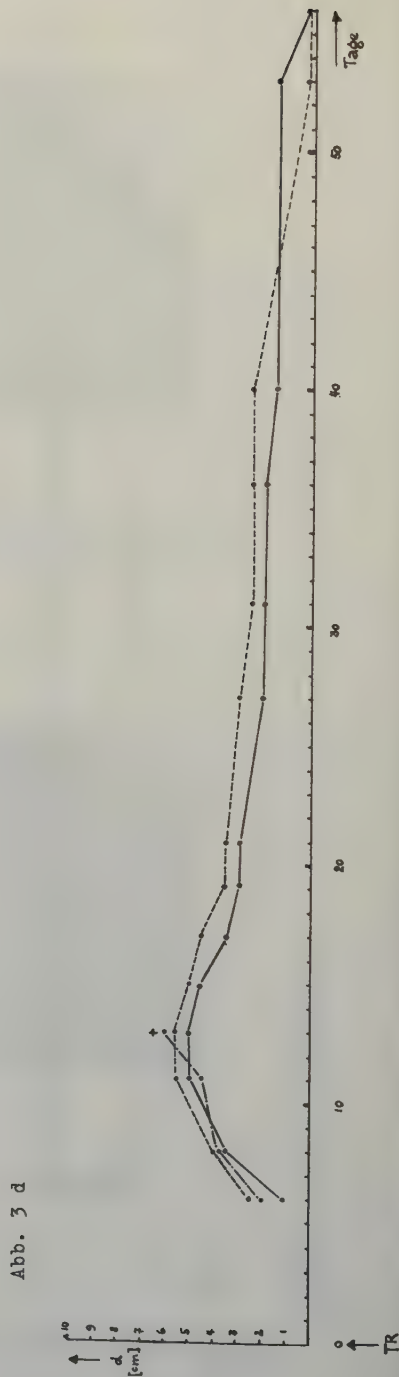
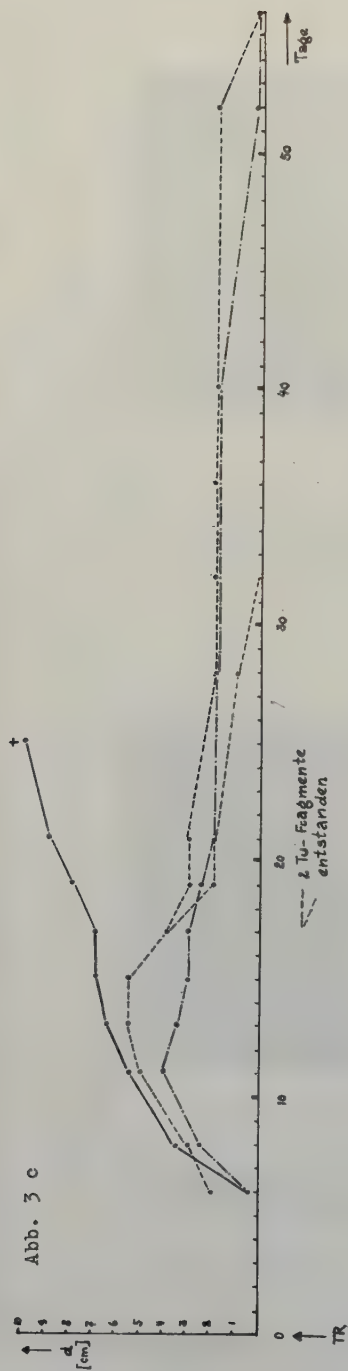


Abb. 3 e

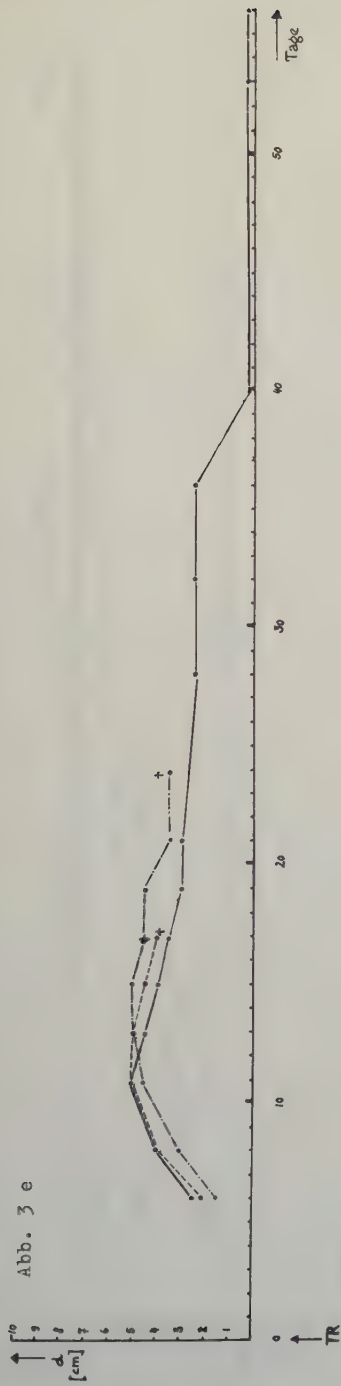


Abb. 3 f

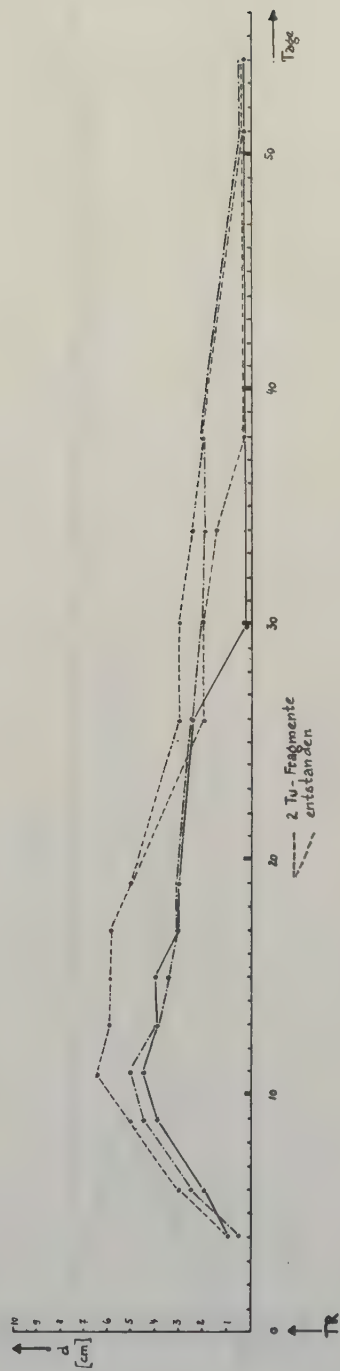


Abb. 3 g

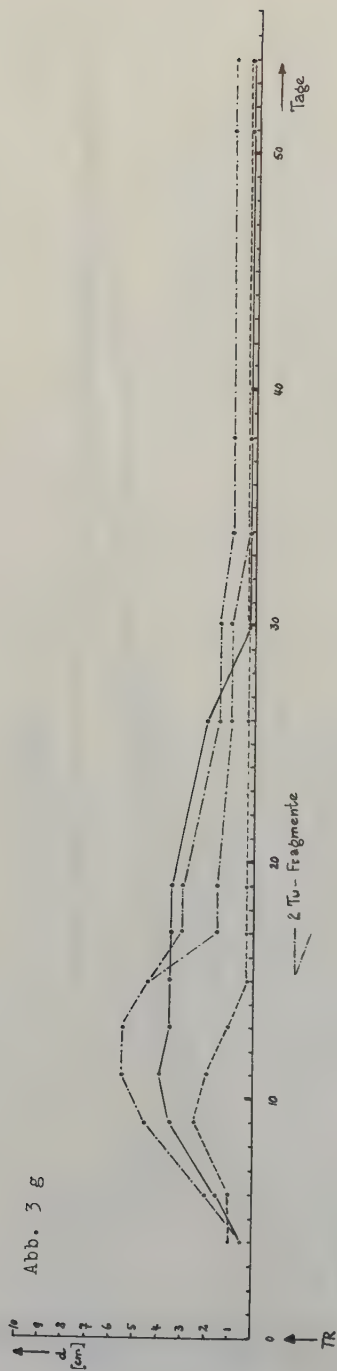


Abb. 3 h

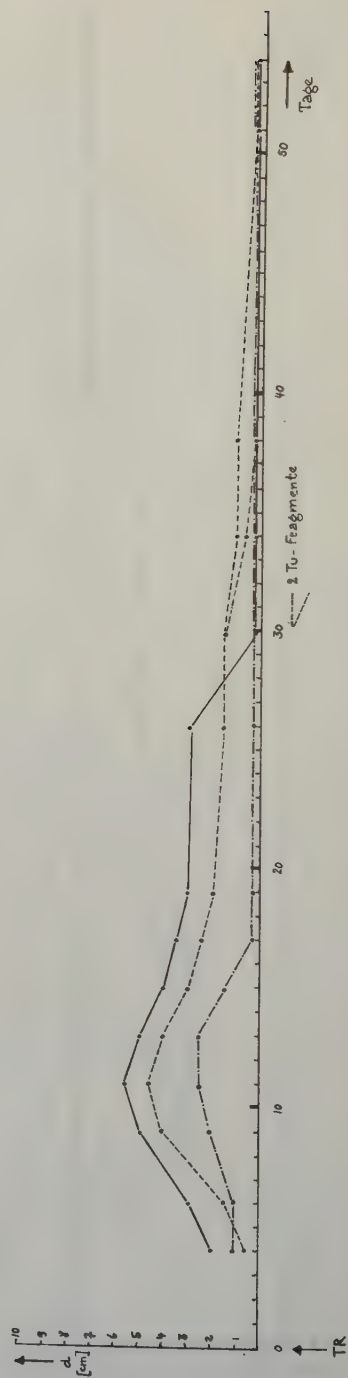


Abb. 3 i



Abb. 3 k

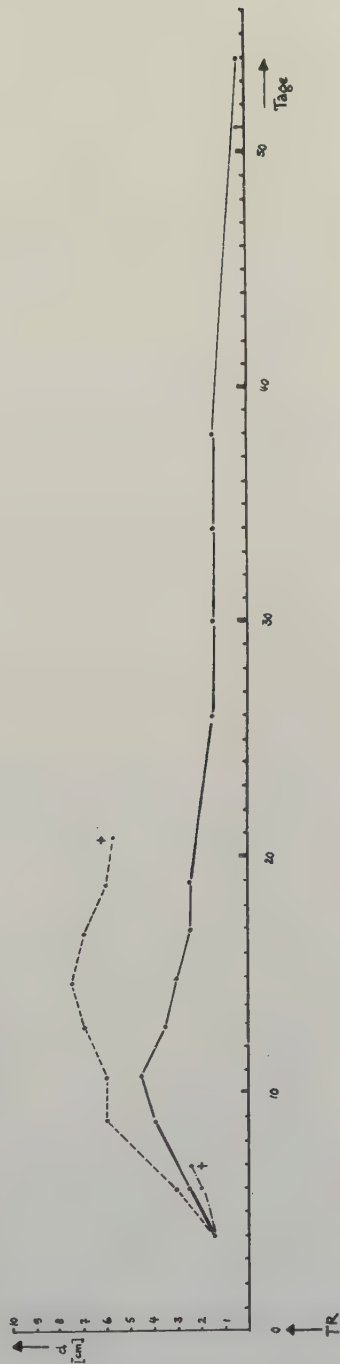


Abb. 3 1

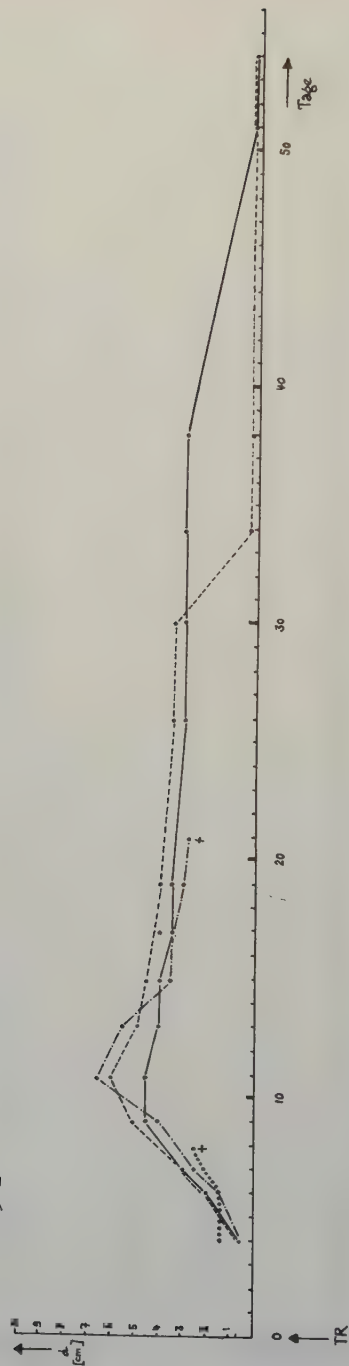


Abb. 4 a bis c

Darstellung des Tumorwachstums
in der Hauptversuchsgruppe II

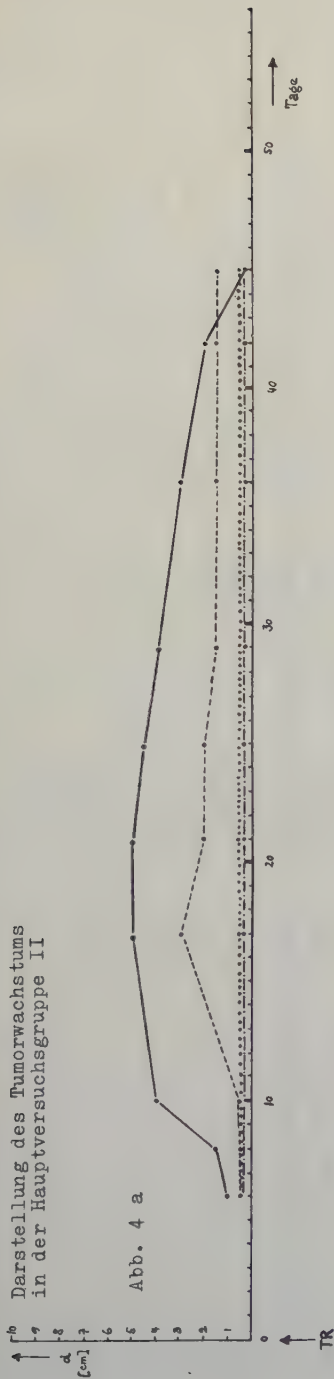


Abb. 4 b

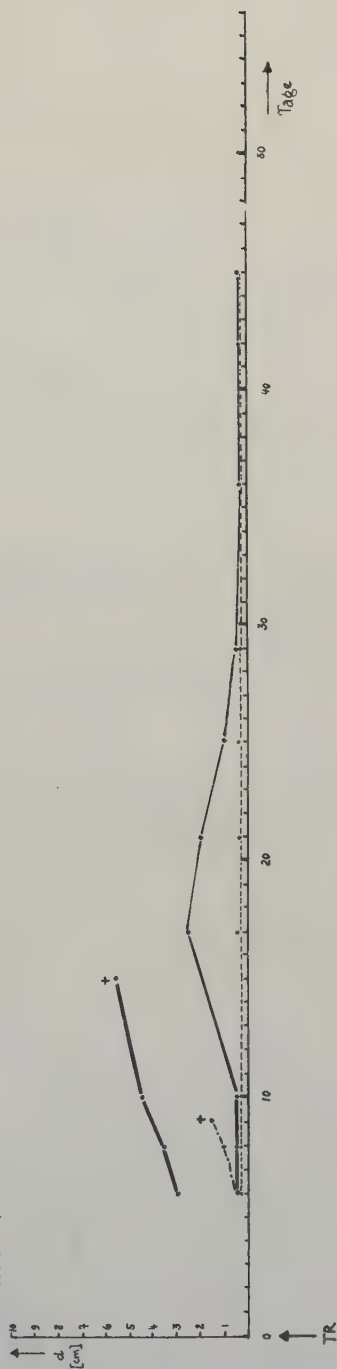
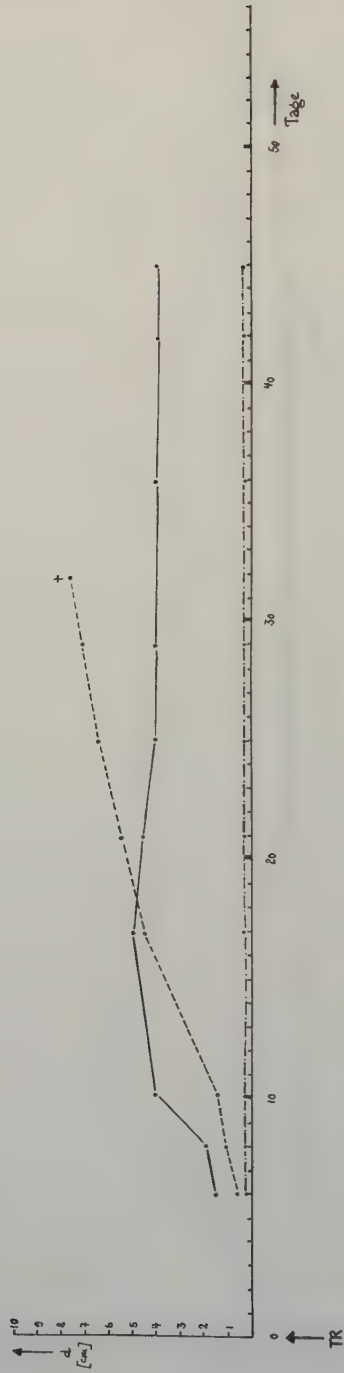


Abb. 4 c



Tab. 1

Beobachtungen an den Versuchstieren. Zusammenfassung der Ergebnisse

I. Zahl der beobachteten, sensibilisierten und mit Tumorzellfiltrat inokulierten Tiere:	46 (100 %)
II. Zahl der Tiere, die einen Tumor besaßen und innerhalb von 15 Tagen nach der Transplantation starben, so daß keine Aussage über ein evtl. Sistieren oder Zurückgehen der Geschwulst gemacht werden kann:	6 (13,04 %)
III. Zahl der Tiere, die die Zeit von 15 Tagen nach Transplantation überlebten und deren Tumor kontinuierlich bis zum Exitus vor Versuchsende weiterwuchs:	3 (6,52 %)
IV. Zahl der Tiere, bei denen der Tumor nicht anging:	6 (13,04 %)
V. Zahl der Tiere, bei denen der Tumor zunächst anging, etwa um den 15. Tag nach Transplantation seinen Wachstumshöhepunkt erreicht hatte, dann sistierte und zurückgebildet wurde:	31 (67,4 %)
VI. Überlebende Tiere am Versuchsende:	30 (65,2 %)

c) Kontrollgruppe

Bei den tumorinokulierten Tieren ohne Vorbehandlung wuchs das WALKER-Carcinom, beobachtbar ab dem 5. Tag nach Transplantation, kontinuierlich bis fast zur Größe des Tieres selbst heran. Acht Ratten starben zwischen dem 25. und 36. Beobachtungstag. Zwei Tiere überlebten bis Versuchsende, ohne daß der Tumor die Tendenz einer Rückbildung gezeigt hätte (Abb. 5 und 6). Eine der beiden letztgenannten Ratten trug einen Tumor, der 170 g schwer, in der Rinde fest, zentral relativ stark nekrotisch war. Das Gewicht des Resttieres selbst betrug 220 g (Abb. 7).

Abb. 5

Wachstumsverlauf der Tumoren in
der Kontrollgruppe (3 Beispiele)

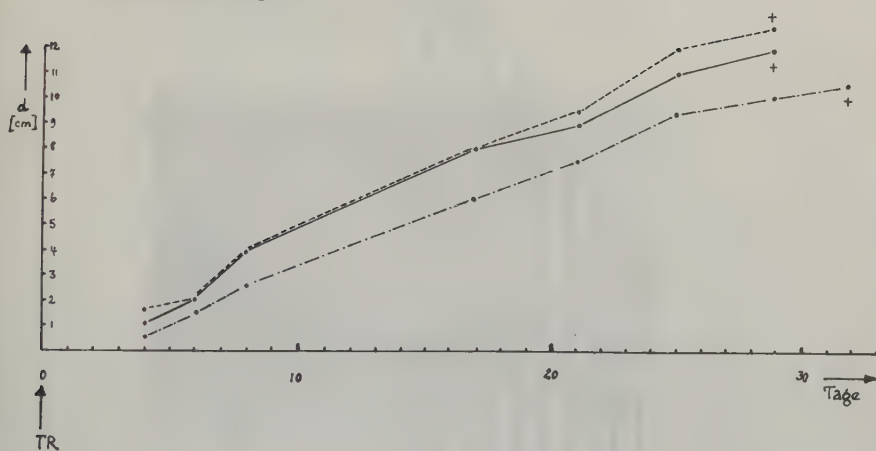
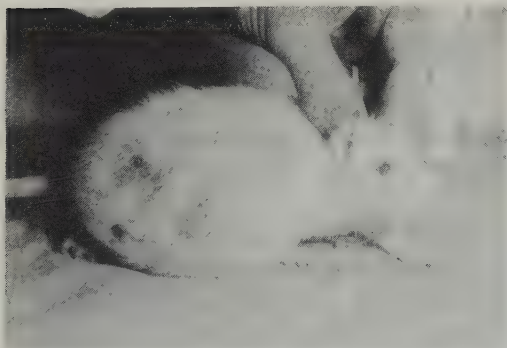




Abb. 6
Überlebenszeiten der Kontrolltiere

Abb. 7

Überlebendes Kontrolltier am Ende
der Beobachtungszeit



2. Serumbefunde

a) Verhalten der Serumeiweißkörper

Die Befunde sind in den Tabellen 2, 3, und 4 wiedergegeben. Leider ließen sich zur Endkontrolle nur 51 Seren testen, da einige Tiere starben, bevor ihnen Blut abgenommen werden konnte.

Bei sämtlichen Tieren läßt sich eine Dysproteinämie unterschiedlicher Intensität nachweisen. Die Tiere der Hauptversuchsreihen zeigen ebenso wie die Kontrolltiere eine statistisch gesicherte Hypalbuminämie, sowie Vermehrung der β -Globuline, jedoch keine nennenswerten Veränderungen der γ -Globuline. (Tab. 4)

Aus der Tabelle der Einzelwerte ist darüber hinaus zu ersehen, daß bei der Kontrolle auch eine Zunahme der α_1 - und α_2 -Globuline objektivierbar wird.

In Einzelfällen wurde im Rahmen schwerster Dysproteinämie eine deutliche Albuminvorfraktion sichtbar. (Abb. 8 und 9)

b) Nachweis zirkulierender, präzipitierender Antikörper

Bei 1. und 2. Blutentnahme (Ausgangswerte bzw. 1. Kontrolle) konnten in keinem der Seren der Hauptversuchsgruppen wie in der Kontrollgruppe zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden. Das bezieht sich sowohl auf die Testung mit Tumoreiweiß als auch mit Humantransferrin.

Die Befunde für die 3. BE sind in Tab. 5 wiedergegeben. Dabei ist zu vermerken, daß die Untersuchungen mit Tumorphomogenaten und nicht mit Zellsuspensionen vorgenommen wurden.

Nr.		Albu- mine	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
1	FE	21	5	2	2	8	6
	rel%	47,7	11,4	4,5	4,5	18,2	13,6
2	FE	20	5	5	5	8	6
	rel%	39,2	9,8	9,8	9,8	15,7	15,7
3	FE	19	5	2	3	10	7
	rel%	41,3	10,9	4,3	6,5	21,8	15,2
4	FE	20	3	3	5	8	9
	rel%	41,7	6,2	6,2	10,4	16,7	18,8
5	FE	25	4	3	4	8	7
	rel%	49,0	7,8	5,9	7,8	15,7	13,7
6	FE	22	3	4	4	7	7
	rel%	46,8	6,4	8,5	8,5	14,9	14,9
7	FE	23	5	3	3	13	8
	rel%	41,8	9,1	5,5	5,5	23,6	14,5
8	FE	18	2	2	3	7	10
	rel%	42,9	4,8	4,8	7,1	16,6	23,8
9	FE	20	3	3	4	7	7
	rel%	45,5	6,8	6,8	9,1	15,9	15,9
10	FE	21	3	3	3	7	5
	rel%	50,0	7,1	7,1	7,1	16,7	11,9
11	FE	78	18	15	15	30	28
	rel%	42,4	9,8	8,1	8,1	16,3	15,2
12	FE	34	11	6	6	23	14
	rel%	36,1	11,7	6,4	6,4	25,2	14,9
13	FE	18	2	1	2	5	4
	rel%	56,2	6,2	3,2	6,2	15,6	12,4
14	FE	17	3	2	3	6	6
	rel%	46,0	8,1	5,4	8,1	16,2	16,2
15	FE	12	4	3	3	7	4
	rel%	36,4	12,1	9,1	9,1	21,2	12,1
16	FE	14	4	2	2	6	6
	rel%	41,2	11,8	5,9	5,9	17,6	17,6
17	FE	21	4	3	3	8	6
	rel%	46,7	8,9	6,6	6,6	17,9	13,3
18	FE	30	10	5	4	18	11
	rel%	38,4	12,8	6,4	5,1	23,1	14,1
19	FE	22	10	5	4	11	12
	rel%	34,4	15,6	7,8	6,2	17,2	18,7
20	FE	23	5	4	6	12	8
	rel%	39,7	8,6	6,9	10,3	20,7	13,8
21	FE	19	5	2	2	8	9
	rel%	42,2	11,1	4,4	4,4	17,8	20,0
22	FE	8	2	1	2	3	3
	rel%	42,1	10,5	5,3	10,5	15,8	15,8
23	FE	27	10	4	4	13	10
	rel%	39,9	14,7	5,9	5,9	19,1	14,7

Tab. 2a

Ausgangswerte der CAF-Elektrophorese
(Hauptversuchstiere)

Nr.		Albu- mine	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
24	FE	30	7	4	5	17	10
	rel%	41,1	9,6	5,5	6,8	23,3	13,7
25	FE	15	4	2	2	6	4
	rel%	45,4	12,1	6,1	6,1	18,2	12,1
26	FE	210	36	25	25	57	37
	rel%	53,8	9,2	6,4	6,4	14,6	9,5
27	FE	24	5	2	3	9	5
	rel%	50,0	10,4	4,2	6,2	18,8	10,4
28	FE	34	12	8	7	16	12
	rel%	38,2	13,5	9,0	7,9	18,0	13,5
29	FE	20	3	2	3	7	6
	rel%	48,8	7,3	4,9	7,3	17,1	14,6
30	FE	38	11	5	5	23	11
	rel%	45,8	13,2	6,0	6,0	15,7	13,2
31	FE	38	11	8	6	19	19
	rel%	37,6	10,9	7,9	5,9	18,8	18,8
32	FE	35	9	6	8	21	14
	rel%	37,6	9,7	6,4	8,6	22,6	15,1
33	FE	39	6	4	6	19	15
	rel%	43,8	6,7	4,5	6,7	21,3	16,9
34	FE	36	9	8	7	15	12
	rel%	41,4	10,3	9,2	8,1	17,2	13,8
35	FE	22	4	2	2	7	5
	rel%	52,4	9,5	4,8	4,8	16,6	11,9
36	FE	14	5	4	3	8	6
	rel%	35,0	12,5	10,0	7,5	20,0	15,0
37	FE	43	8	6	6	19	13
	rel%	45,3	8,4	6,3	6,3	20,0	13,7
38	FE	25	6	3	2	8	6
	rel%	50,0	12,0	6,0	4,0	16,0	12,0
39	FE	37	10	7	5	16	14
	rel%	41,6	11,2	7,9	5,6	18,0	15,7
40	FE	26	7	4	5	9	9
	rel%	43,3	11,7	6,7	8,3	15,0	15,0
41	FE	42	17	8	6	18	17
	rel%	38,9	15,7	7,4	5,6	16,7	15,7
42	FE	34	11	7	6	14	10
	rel%	41,5	13,4	8,5	7,3	17,1	12,2
43	FE	22	5	3	3	8	9
	rel%	44,0	10,0	6,0	6,0	16,0	18,0
44	FE	26	8	4	4	11	10
	rel%	41,3	12,7	6,3	6,3	17,5	15,9
45	FE	15	5	3	3	7	6
	rel%	38,5	12,8	7,7	7,7	17,9	15,4
46	FE	34	10	6	6	12	11
	rel%	43,0	12,7	7,6	7,6	15,2	13,9

Tab. 2b

Endwerte der CAF-Elektrophorese FE Flächeneinheiten
(Hauptversuchstiere)

Es konnte nur von 42 der 46 weiter-
beobachteten Tiere Serum erhalten werden.

Nr.		Prä- alb.	Albu- mine	Globuline				
				α_1	α_2	α_3	β	γ
1	FE	Ø	26	10	8	7	25	13
	rel%		29,2	11,2	9,0	7,9	28,1	14,6
2	FE	Ø	30	15	14	15	36	17
	rel%		23,6	11,8	11,0	11,8	28,3	13,4
3	FE	Ø	46	28	14	14	33	19
	rel%		29,9	18,2	9,1	9,1	21,4	12,3
4	FE	Ø	29	16	13	18	25	16
	rel%		24,8	13,7	11,1	15,4	21,4	13,7
5	FE	Ø	36	25	14	12	27	21
	rel%		27,4	18,5	10,4	8,9	20,0	15,6
6	FE	Ø	33	24	8	7	26	12
	rel%		30,0	21,8	7,3	6,4	23,6	10,9
7	FE	Ø	31	12	8	5	19	13
	rel%		35,2	13,6	9,1	5,7	21,6	14,8
8	FE	Ø	32	23	12	10	27	14
	rel%		27,1	19,5	10,2	8,5	22,9	11,9
9	FE	Ø	40	25	14	13	33	19
	rel%		27,8	17,4	9,7	9,0	22,9	13,9
10	FE	Ø	40	12	7	7	20	9
	rel%		42,1	12,6	7,4	7,4	21,0	9,5
11	FE	Ø	65	22	14	13	47	35
	rel%		33,2	11,2	7,1	6,6	24,0	17,9
12	FE	Ø	30	10	8	9	15	13
	rel%		35,3	11,8	9,4	10,6	17,6	15,3
13	FE	Ø	73	19	13	13	46	28
	rel%		38,0	9,9	6,8	6,8	23,9	14,6
14	FE	+	54	13	12	11	37	23
	rel%		36,0	8,7	8,0	7,3	24,7	15,3
15	FE	Ø	25	22	23	12	29	18
	rel%		19,4	17,0	17,8	9,3	22,5	14,0
16	FE	Ø	52	20	14	12	30	17
	rel%		35,9	13,8	9,6	8,3	20,7	11,7
17	FE	Ø	47	18	9	9	23	16
	rel%		38,5	14,7	7,4	7,4	18,9	13,1
18	FE	Ø	44	20	13	10	32	29
	rel%		29,7	13,5	8,8	6,8	21,6	19,6

Nr.		Prä- alb.	Albu- mine	Globuline				
				α_1	α_2	α_3	β	γ
19	FE	Ø	40	16	12	13	31	20
	rel%		30,3	12,1	9,1	9,8	23,5	15,2
20	FE	Ø	41	13	10	7	20	16
	rel%		38,3	12,1	9,3	6,5	18,7	15,0
21	FE	Ø	30	21	21	13	37	23
	rel%		20,7	14,5	14,5	9,0	25,5	15,9
22	FE	Ø	37	17	11	11	23	19
	rel%		31,4	14,4	9,3	9,3	19,5	16,1
23	FE	Ø	40	17	11	8	24	13
	rel%		35,4	15,0	9,7	7,1	21,2	11,5
24	FE	Ø	44	22	18	12	32	21
	rel%		29,5	14,8	12,1	8,0	21,5	14,1
25	FE	Ø	26	7	4	4	12	12
	rel%		40,0	10,8	6,2	6,2	18,5	18,5
26	FE	Ø	26	5	3	4	11	8
	rel%		45,6	8,8	5,3	7,0	19,3	14,0
27	FE	Ø	50	15	12	11	33	24
	rel%		34,5	10,3	8,3	7,6	22,8	16,5
28	FE	+	26	10	6	6	21	14
	rel%		31,3	12,1	7,2	7,2	25,3	16,9
29	FE	Ø	36	11	10	10	25	19
	rel%		32,4	9,9	9,0	9,0	22,5	17,1
30	FE	+	50	11	8	8	27	23
	rel%		39,4	8,7	6,3	6,3	21,2	18,1
31	FE	+	41	15	10	8	27	12
	rel%		36,3	13,3	8,8	7,1	23,9	10,6
32	FE	+	45	14	9	8	31	20
	rel%		35,4	11,0	7,1	6,3	24,4	15,7
33	FE	Ø	54	12	7	6	26	18
	rel%		43,9	9,8	5,7	4,8	21,1	14,6
34	FE	Ø	53	20	13	11	31	27
	rel%		34,2	12,9	8,4	7,1	20,0	17,4
35	FE	+	38	11	9	10	25	22
	rel%		33,0	9,6	7,8	8,7	21,7	19,1
36	FE	+	40	25	23	13	45	24
	rel%		23,5	14,7	13,5	7,6	26,5	14,1

Nr.		Prä- alb.	Albu- mine	Globuline				
				α_1	α_2	α_3	β	γ
37	FE	+	45	18	12	12	37	24
	rel%		30,4	12,2	8,1	8,1	25,0	16,2
38	FE	Ø	31	19	22	9	28	17
	rel%		24,6	15,1	17,5	7,1	22,2	13,5
39	FE	Ø	22	14	18	11	15	9
	rel%		24,7	15,7	20,2	12,4	16,9	10,1
40	FE	Ø	47	23	12	10	37	25
	rel%		30,5	14,9	7,8	6,5	24,0	16,2
41	FE	Ø	33	20	14	8	30	22
	rel%		26,0	15,7	11,0	6,3	23,6	17,3
42	FE	+	28	22	20	11	29	13
	rel%		22,8	17,9	16,3	8,9	23,6	10,6

Nr.		Albu- mine	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
K 1	FE	26	7	5	6	10	9
	rel%	41,3	11,1	8,0	9,5	15,9	14,3
K 2	FE	19	8	4	4	9	8
	rel%	36,6	15,4	7,7	7,7	17,3	15,4
K 3	FE	15	6	3	2	8	7
	rel%	36,6	14,6	7,3	4,9	19,5	17,1
K 4	FE	22	8	5	5	10	10
	rel%	36,7	13,3	8,3	8,3	16,7	16,7
K 5	FE	24	7	4	3	9	9
	rel%	42,8	12,5	7,1	5,4	16,1	16,1
K 6	FE	29	7	6	5	13	13
	rel%	39,8	9,6	8,2	6,8	17,8	17,8
K 7	FE	23	8	5	4	11	8
	rel%	39,0	13,6	8,5	6,8	18,6	13,6
K 8	FE	29	9	4	4	9	9
	rel%	45,3	14,1	6,2	6,2	14,1	14,1
K 9	FE	19	6	3	3	8	8
	rel%	40,4	12,8	6,4	6,4	17,0	17,0
K 10	FE	29	8	5	6	13	11
	rel%	40,2	11,1	7,0	8,3	18,1	15,3

Tab. 3a

Ausgangswerte der CAF-Elektrophorese
(Kontrolltiere) FE Flächeneinheiten

Nr.		Prä- alb.	Albu- mine	Globuline				
				α_1	α_2	α_3	β	γ
K 1	FE	Ø	32	14	8	5	22	12
	rel%		34,4	15,0	8,6	5,4	23,7	12,9
K 2	FE	Ø	51	28	18	12	33	16
	rel%		32,3	17,7	11,4	7,6	20,9	10,1
K 4	FE	Ø	41	32	13	10	34	20
	rel%		27,3	21,3	8,7	6,7	22,7	13,3
K 6	FE	Ø	32	28	30	18	40	36
	rel%		17,4	15,2	16,3	9,8	21,7	19,6
K 7	FE	Ø	35	24	37	13	30	20
	rel%		22,0	15,1	23,3	8,2	18,9	12,6
K 8	FE	Ø	57	9	6	7	27	19
	rel%		45,6	7,2	4,8	5,6	21,6	15,2
K 9	FE	+	40	12	8	7	24	22
	rel%		35,4	10,6	7,1	6,2	21,2	19,5
K 10	FE	+	32	18	13	9	27	30
	rel%		24,8	13,9	10,1	7,0	20,9	23,2

Tab. 3b

Endwerte der CAF-Elektrophorese
(Kontrolltiere) FE Flächeneinheiten

CAF - Elektrophorese rel. %							
		Hauptversuchsgruppe			Kontrollgruppe		
		Alb.	β -Glob.	γ -Glob.	Alb.	β -Glob.	γ -Glob.
A	M_a	43.2	18.1	14.9	39.9	17.1	15.7
	$\sigma_{M_a} \pm$	5.09	2.598	6.58	2.62	1.53	1.43
E	M_e	31.8	22.3	14.7	29.9	21.5	15.8
	$\sigma_{M_e} \pm$	6.21	2.58	2.5	8.42	1.41	4.48
A/E	$\sigma_{diff.}$	1.22	0.56	0.54	3.09	0.64	1.31
	t	9.34	7.5	0.37	3.24	6.87	0.076

Tab. 4

Statistische Auswertung der
Elektrophoresewerte

A Ausgangswerte E Endwerte

			Tumor- Homogenat	Human- Transferrin	Tumorzelle- HTF-Komplex
		n	3. BE	3. BE	3. BE
Seren der Hauptvers.-F.	I	33	32 $\emptyset$ 1(+)	33 +	33 +
	II	9	$\emptyset$	9(+)	9(+)
Seren der Kontrolltiere		8	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$

Tab. 5
Befunde der zweidimensionalen Immunodoppeldiffusion:
Tierseren der 3. BE gegen die drei Testsubstrate

Abb. 8

Dysproteinämie: Hypalbuminämie mit Vermehrung von α_1 - und α_2 -Globulin, sowie von β -Globulin. Vgl. Nr. 39 der CAF-Endwerte Tab. 2 b

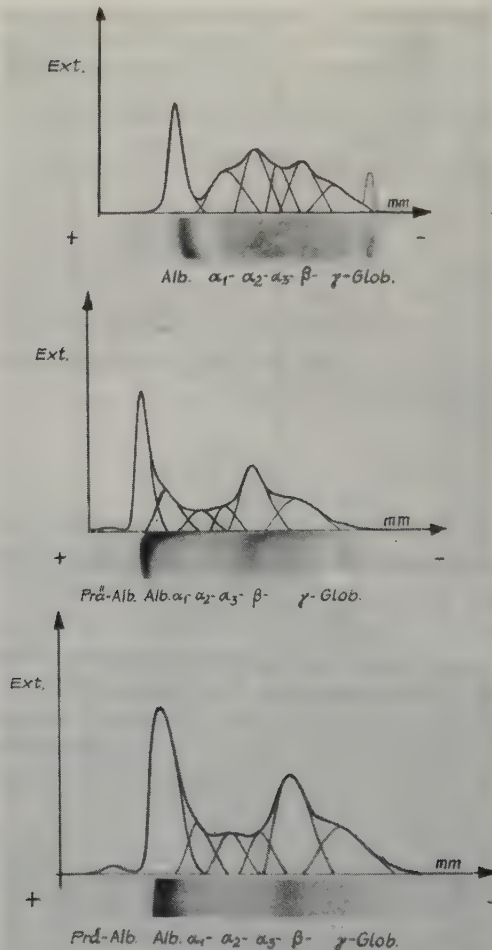


Abb. 9 a und b

Dysproteinämie mit Albumin-Vorfraktion. Vgl. Nr. 28 und 14 in Tab. 2 b

3. Organbefunde

a) Makroskopische Beurteilung der Resttumoren und der Milz

Bei Durchschnitt durch einen Resttumor ergab sich von außen nach innen folgende Schichtung:
Bindegewebige Kapsel, dicke, kompakte Eiterrinde und darin eingeschlossene, nekrotische Reste des Carcinoms.

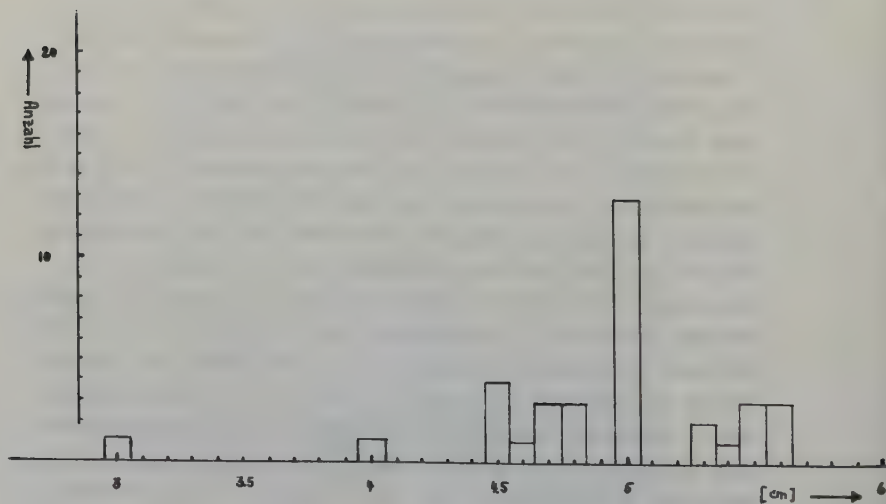
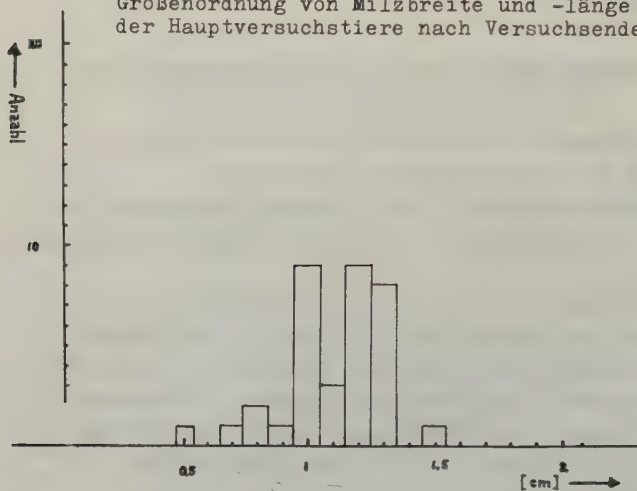
Den Abbildungen 10 a und b ist zu entnehmen, daß die Milzgrößen der verschieden behandelten Tiere beider Hauptversuchsgruppen kurz ante finem bzw. am Ende der Beobachtungszeit annähernd gleich waren. Sie zeigen darüber hinaus eine nur unwesentliche Vergrößerung gegenüber Milzorganen nicht behandelter Ratten.
(Normalgröße ca. 3,0 x 0,5 cm)

b) Mikroskopische Beurteilung verbliebener Resttumoren

Histologisch zeigte sich im Bereich der Residualtumoren vorwiegend eine peritumorale bzw. zirkulär angeordnete Anhäufung von mononukleären, im wesentlichen lymphoidzelligen Elementen, die teilweise in die verbliebenen Tumorbezirke infiltrierten (Abb. 11 a und b). Die Lymphozyten zeigten zum Teil blastomatöse Formveränderungen, ihre Größen bzw. Zelldurchmesser variierten insbesondere im Bereich der Tumorzellnekrosen. Von den zentral gelegenen Tumorzellen waren in den untersuchten Fällen zahlreiche Kernpyknosen, sowie ausgesprochene Nekrosen nachweisbar. (Abb. 11 c und d). Darüber hinaus wurden vereinzelt plasmoidzellige Elemente angetroffen. In zwei Beispielen fanden sich im peritumoralen Bereich eines relativ größeren Rest-Carcinoms polymorphkernige, sowie eosinophile Leukozyten in der Überzahl gegenüber den mononukleären Zellen. Auch hier waren wiederum Plasmazellen eingestreut. Der Tumor selbst zeigte ebenfalls hochgradige Nekrosen (Abb. 12 a, b, c).

Abb. 10a und b

Größenordnung von Milzbreite und -länge
der Hauptversuchstiere nach Versuchsende



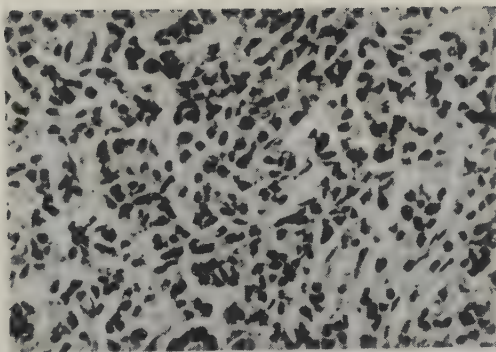


Abb. 11 a

Übersicht: Walker-Carcinom einer unbehandelten Ratte, Vergr. 128x

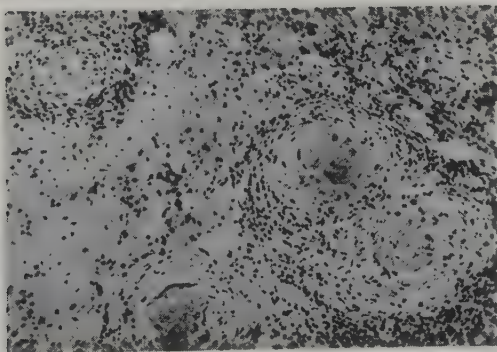


Abb. 11 b

Übersicht: Vorwiegend zirkulär, wallartig angeordnete Lymphozytenanhäufungen, die Tumorzellnekrosen einschließen, Vergr. 80x

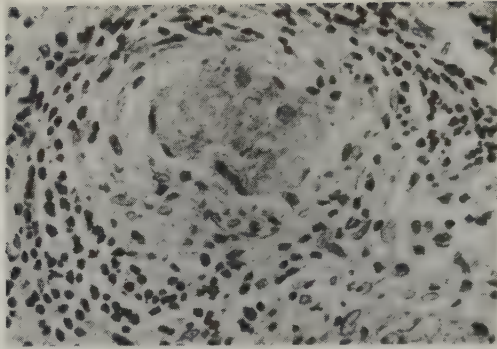
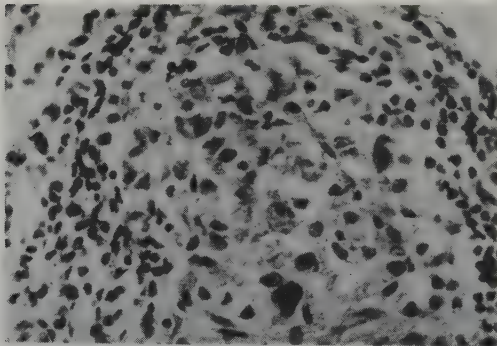


Abb. 11 c und d

Nekroseherde von 11 b in stärkerer Vergrößerung: deutliche Kernpyknosen, kernlose Zelleiber. Vergr. 128x und 320x



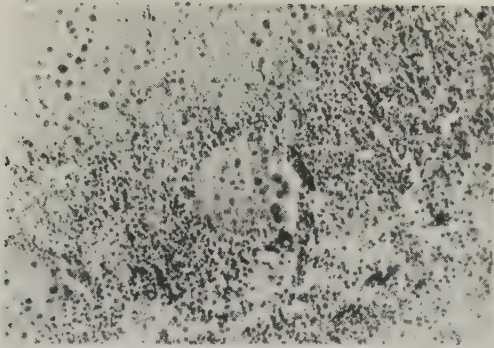


Abb. 12 a und b

Vorwiegend polymorphkernige peritumorale
und intratumorale Infiltration. Wahr-
scheinlich auf dem Boden einer Sekundär-
infektion. Vergr. 80x

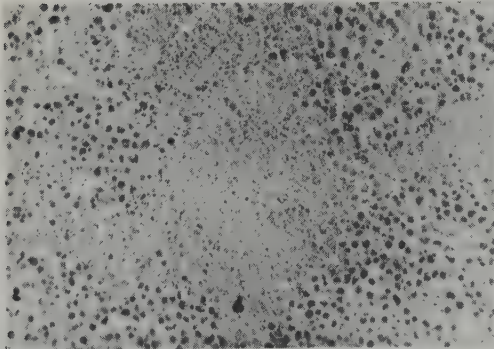
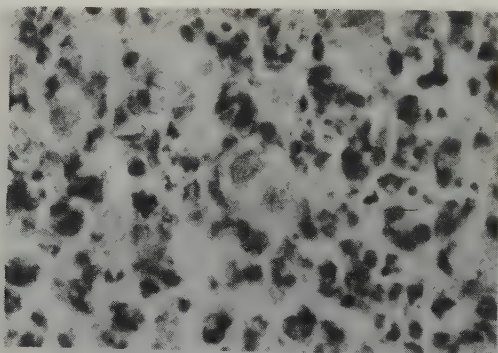


Abb. 12 c

Ausschnitt aus 12 a. Vergr. 800x. Öl



C. Diskussion

Vorliegende Ergebnisse haben gezeigt, daß bei unbehandelten Ratten die Applikation eines Zellfiltrates aus lebenden WALKER-Carcinom-Zellen, gekoppelt an Humantransferrin, die Entwicklung später inokulierter WALKER-Carcinom-Zellen zu einem soliden Tumor in einem Prozentsatz von 80 % zu verhindern vermag. Die Erfolgchancen waren weniger günstig, wenn die Transplantation in kürzerem zeitlichen Abstand nach Beendigung der Sensibilisierungsserie erfolgte.

Die Befunde zeigen, daß ein mit Tumorzellen sensibilisierter Organismus eine tumorspezifische, immunologische Abwehrsituation erlangt, die in einem relativ hohen Prozentsatz ausreicht, um transplantierte, in ihrem antigenen Material gleichartig beschaffene Tumorzellen im Sinne einer "second set reaction" abzustossen. Die Befunde zeigen darüber hinaus, daß ein solcher Organismus eine optimale Latenzzeit zur Heranreifung seiner sensibilisierten Zellkloni benötigt, um ausreichend immunologisch aktive Zellen bereit zu haben, damit ein Transplantat, das ohne Vorbehandlung des Empfängerorganismus in diesem ohne weiteres angeht, entweder sofort oder nach einem passageren, geringen Wachstumsphänomen zur Abstoßung gezwungen wird. Diese Untersuchungsbefunde stehen im Einklang mit ähnlich gelagerten Versuchsanordnungen aus dem eigenen Arbeitskreis (17, 18, 44, 45, 46, 48), ferner mit Befunden von Untersuchern, die die Tumor-Antigen-Maskierung z. B. mit Jodacetat (3), mit Haptenen der Benzoe-Reihe (28, 33), mit Knoblauch (14), mit Tuberkelbakterien (54) durchgeführt oder eine Polymerisierung der TST-Antigene durch Einführen von Formaldehyd in das Tumorzellfiltrat vorgenommen haben (12). Sie können aber auch mit Ergebnissen verglichen werden, die durch Vorbehandlung von Tieren mit einer relativ geringeren Zellzahl lebender Tumorzellen - im Vergleich zur notwendigen Zellzahl für das Angehen einer Erfolgstransplantation des gleichen Tumors - gewonnen worden sind.

Die Reapplikation löslicher Tumorproteine, mit anderen Worten eines Tumor-Homogenats, führt bei prinzipiell gleicher Versuchsanordnung, auch bei Emulgierung mit FREUNDschem Adjuvans zu keiner merklichen Beeinflussung des Tumorwachstums im Sinne einer Hemmung (19, 46, 47). Die Erklärung liegt darin, daß lösliche Zellproteine vorwiegend dem Zyto- und Nukleoplasma und nicht der Zellmembran entstammen. Alle bisherigen experimentellen und klinischen Erfahrungen sprechen dafür, daß Tumor-Antigenität der Transplantat-Antigenität normaler Gewebe vergleichbar ist und somit an Zellmembranfaktoren vom Typ der H-Antigene, hier TST-Antigene, gebunden ist.

Die Koppelung von Humantransferrin an Tumorzellen bewirkt entweder eine Maskierung der oberflächlich verankerten T-Antigene und bewirkt zugleich eine Vergrößerung des Oberflächenmoleküls, wodurch eine aktive Immunisierung ausgelöst wird. Die Tatsache, daß die vormals tolerierte Tumorzelle gewissermaßen in den Antigen-Komplex mit einbezogen ist, wie dies im übrigen fluoreszenzoptisch unter Beweis gestellt werden konnte, führt dazu, daß mit Bezug auf die primär stimulierten Zellkloni ein Booster-Effekt ausgeübt wird. Es ist durchaus möglich, daß darüber hinaus auch neue, zelluläre Antikörper gebildet werden, die nicht nur gegen das transferringekoppelte Oberflächenantigen sondern mit Teilspezifität auch gegen die Tumorzelle gerichtet sind. Wie die vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, werden u. a. zirkulierende, molekulare Antikörper gegen das heterologe Humantransferrin und in einem kleinen Prozentsatz wahrscheinlich auch gegen lösliche Tumorzellproteine gebildet. Die Feststellung, daß bei Endkontrolle im Serum der Tiere der Hauptversuchsgruppen tumorspezifische, zirkulierende Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten, ist mit dem hinlänglich bekannten Enhancementphänomen zu erklären: Molekulare Antikörper können sich als blockierende Antikörper an Zelloberflächenantigene der Tumorzelle fixieren; sie schwinden infolgedessen aus dem peripheren Blut.

Durch die erfolgte aktive Sensibilisierung wurde nach den vorliegenden histologischen Befunden eine intensive, tumorspezifische, zelluläre Immunreaktion ausgelöst. Das zeitlich später

inokulierte WALKER-Carcinom-Zelltransplantat verhielt sich infolgedessen wie ein spezifisches Zweittransplantat nach durchbrochener Toleranz: es wurde nicht mehr akzeptiert. Es handelt sich hierbei um eine Art der Adoptivimmunität, nur mit dem entscheidenden Unterschied, daß hier körpereigene Zellkloni und nicht xenologe oder homologe sensibilisierte Lymphozyten die spezifische Tumorabwehr vollziehen. Das Ergebnis einer solchen Anregung zu einer gezielten Immunzellreifung sollte unter die Begriffe Induktions- oder akquirierte Immunität eingereiht werden.

Im Vergleich zur Adoptivimmunität hat diese Versuchsanordnung vor allem im Hinblick auf humantherapeutische Konsequenzen den Vorteil, daß jegliche Art von Nebenwirkungen im Sinne der Iso- oder Xenosensibilisierung gegen passiv übertragene Lymphozyten oder im Sinne des "wasting-syndroms" ausgeschaltet werden können. Zu bedenken sind bei vorliegender Versuchsanordnung lediglich die Heteroantikörper gegen Humantransferrin, die im Falle einer Dauerbehandlung zur Erhaltung der Antikörperaktivität u. U. die Entwicklung von Immunkomplexen begünstigen können. Die Langzeittherapie mit ALG hat jedoch diese Bedenken auch ohne Toleranzinduktion für das xenologe Trägerserum weitgehend entkräftet: anfänglich nachweisbare, zirkulierende Antikörper, z. B. gegen Pferde- γ -Globulin haben im Verlaufe der weiteren Applikation an Konzentration (Titerhöhe) abgenommen.

Die praktischen Konsequenzen der vorliegenden Untersuchungsergebnisse sind folgende:

1. Bei Existenz eines "Spontantumors" gilt es

- a) das antigene Tumormaterial so weit wie möglich operativ zu entfernen. Die Zerstörung von Tumorgewebe durch Zytostatika oder Röntgenbestrahlung ist möglichst zu umgehen (s. u.);
- b) die tumorspezifischen, antikörperbildenden Immunzellen durch gezielte Antigenapplikation im Sinne der vorliegenden Versuchsanordnung klonal zu stimulieren;

- c) jegliche Faktoren, die eine Hemmung des immunologisch aktiven Systems bewirken können, wie Zytostatika, Röntgen- oder Radiumbestrahlung, zu vermeiden;
- d) allgemein roborierende Maßnahmen mit medikamentöser (Vitamin B₁₂) Applikation - auch dann, wenn u. U. Vit. B₁₂ den Tumorzellstoffwechsel selbst fördert - und Verabfolgung eines virostatistischen Breitbandantibiotikums als prophylaktische Maßnahme für den Fall einer Vergesellschaftung des Tumors mit Viruseinschlüssen einzuleiten.

2. Prophylaktische Applikation von Tumorzellmaterial:

- a) Anwendung kleiner Dosen eines homologen Mischzellfiltrats verschiedener Malignomtypen mit der Absicht, Zellklone zu spezifischer Tumorantikörper-Bildung anzuregen und sie damit gewissermaßen für eine später mögliche Tumorentwicklung im eigenen Organismus zu präformieren.
- b) Aktive Sensibilisierung mit spezifischen TSTA, die aus der Membran von verschiedenartigen Tumorzellen isoliert werden.

Wiewohl die beiden letztgenannten Diskussionspunkte vorerst noch utopischen Charakter besitzen, sind dem einschlägigen Schrifttum mit Bezug auf die unter 2. aufgeführten Möglichkeiten einer immunologischen Hemmung autologen Tumorstwachstums bereits klinische Erfahrungen zu entnehmen (2, 4, 7, 9, 16, 20, 21, 25, 27, 34, 35, 36 a und b, 38, 51), die durchaus zu Optimismus berechtigen.

D. Zusammenfassung

In vorliegenden Versuchsreihen wurden Wistar-Ratten mit einem mittels der BDB-Technik gekoppelten Tumor-Transferrin-Komplex (aus WALKER-Carcinomzellen) über 10 Tage hinweg sensibilisiert und anschließend mit WALKER-Carcinom inokuliert. Einer gleichzeitig beobachteten Gruppe von Kontrolltieren wurde nur Carcinom transplantiert. In den vorbehandelten Gruppen wurde in ca. 80 % das Wachstum der Tumoren hintangehalten oder nach passagerem Wachstum zur völligen Rückbildung gezwungen. In der Kontrollgruppe wuchsen sämtliche Tumoren kontinuierlich bis zum Exitus der Tiere zwischen dem 26. und dem 36. Tag. Die Beobachtungszeit der erfolgreich behandelten Ratten betrug 54 Tage.

E. Literatur:

1. ALEXANDER, P.

The role of tumor-specific antigens in the genesis, development and control of malignant disease. In: The biology of cancer, hsg. von AMBROSE, E. J. und F. J. C. ROE. (Van Nostrand, London 1966)

2. ANDREWS, G. A., C. C. CONGDON, C. L. EDWARDS, N. GENGOZIAN, B. NELSON, and H. VODOPICK

Preliminary trials of clinical immunotherapy. Cancer Res. 27, 2535 (1967)

3. APFFEL, C. A., B. G. ARNASON, and J. H. PETERS

Induction of tumour immunity with tumour cells treated with iodoacetate. Nature (London) 209, 694 (1966)

4. BOYD, W.

The spontaneous regression of cancer. (Thomas, Springfield 1966)

5. BOYSE, E. A., L. J. OLD, and H. OETTGEN

Tumor Immunology. Textbook of immunopathology. MIESCHER, P. A. and J. H. MUELLER-EBERHARDT, Grune & Stratton, New York

6. BOYSE, E. A., L. J. OLD, and E. STOCKERT

The TL (thymus leukemia) antigen: A review, IVth International Symposium for Immunopathology, New York, 23, (1965)

7. BRUNSCHWIG, A., C. M. SOUTHAM, and A. G. LEVIN

Host resistance to cancer: Clinical experiments by homo-transplants, autotransplants, and admixture of autologous leucocytes. Ann. Surg. 162, 416 (1965)

8. BURCK, H. CH.

Histologische Technik, 2. Aufl. (Thieme, Stuttgart 1969)

9. BURROWS, D. and D. W. NEILL
Investigation of the immunologically active constituent of serum of patients with carcinoma. Brit. med. J. 370 (1958, I)
10. COONS, A. H. and M. KAPLAN
Localisation of antigen in tissue cells. J. exp. Med. 91, 1 (1950)
11. COONS, A. H., H. J. CREECH, and R. N. JONES
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 47, 200 (1941)
12. CSABA, G.
Attempts to induce antitumour immunity with living attenuated cells. Neoplasma (Bratisl.) 14, 167 (1967)
13. FOLEY, E. J.
Attempts to induce immunity against mammary adenocarcinoma in inbred mice. Cancer Res. 13, 578 (1953)
14. FUJIWARA, M. and T. NATATA
Induction of tumour immunity with tumour cells with extract of garlic (Allium sativum). Nature (London) 216, 83 (1967)
15. GALLMEIER, W. M. und H. F. OETTGEN
Tumorimmunologie. Dtsch. med. Wschr. 93, 1114 (1968)
16. GERICKE, D.
Aspekte der Immuntherapie maligner Tumoren. Med. Klinik 63, 1143 (1968)
17. GÖTZ, H.
Antigenität von Tumorproteinen. Habilitationsschrift, Erlangen 1968

18. GÖTZ, H. und H. FLÜGEL
Weitere Studien zur Frage einer immunologischen Wachstums-
hemmung maligner Tumoren. Med. exp. 19, 149 (1969)
19. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ und U. KLOBE
Serologische und immunologische Studien an tumortragenden
Ratten unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittl. II:
Walker-Tumoren. (Für den Druck vorbereitet)
20. GORER, P. A.
Some recent work on tumor immunity. Adv. Cancer Res. 4, 149
(1956)
21. GRACE, T. J. Jr.
Clinical aspects of immunity in untreated cancer. Ann. N. Y.
Acad. Sci. 114, 736 (1964)
22. GROSS, I.
 - a) Importance of dosage in intradermal immunization against
transplantable neoplasma. Cancer Res. 3, 770 (1943)
 - b) Specificity of acquired tumor immunity. J. Immunol. 50, 91
(1945)
23. HABEL, K.
 - a) Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted
polyoma tumors. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 106, 722
(1961)
 - b) Immunological determinants of polyoma virus oncogenesis.
J. exp. Med. 115, 181 (1962)
 - c) Specific CF antigens in polyoma tumors and transformed
cells. Virology 25, 55 (1965)
24. HASELOFF, O. W. und H.-J. HOFFMANN
Kleines Lehrbuch der Statistik. Für Naturwissenschaft und
Technik, Psychologie, Sozialforschung und Wirtschaft. 3. Aufl.
(Walter de Gruyter & Co., Berlin 1968)

25. HELLSTRÖM, I., K. E. HELLSTRÖM, G. PIERCE, and J. P. S. YANG
Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. Nature (London) 220, 1352 (1968)
26. HENNING, N.
Klinische Laboratoriumsdiagnostik. 3. Aufl., (Urban & Schwarzenberg, München/ Berlin/ Wien, 1966)
27. HOWARD, J. M.
Studies of autotransplantation of incurable cancer. Surg. Gynec. Obstet. 117, 567 (1963)
28. JOLLÈS, G. et R. MARAL
Modifications antigéniques des cellules cancéreuses. C. R. Acad. Sc. Paris 267, 1241 (1968)
29. KLEIN, E. and G. KLEIN
Antigenic properties of lymphomas induced by the Moloney agent. J. nat. Cancer Inst. 32, 547 (1964)
30. KLEIN, G. and E. KLEIN
Antigenic properties of other experimental tumors. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 27, 463 (1962)
31. KLEIN, G., H. O. SJÖGREN, E. KLEIN, and K. E. HELLSTRÖM
Demonstration of resistance against methylcholanthrene induced sarcomas in the primary autochthonous host. Cancer Res. 20, 1561 (1960)
32. KOHN, J.
a) A new supporting medium for zone electrophoresis. Biochem. J. 65, 9 (1957)
b) Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese. Ärztl. Labor 10, 233 (1964)

33. KOSOWER, E. M.

The therapeutic possibilities arising from the chemical modifications of proteins. Proc. N. A. S. 53, 897 (1965)

34. MATHE, G.

Les réactions immunologiques (spontanées ou à visées thérapeutiques) et l'évolution des cancers (Revue générale). Europ. J. Cancer 1, 1 (1965)

35. MATHE, G., L. SCHWARZENBERG, J. L. AMIEL, M. SCHNEIDER, A. CATTAN, and J. R. SCHLUMBERGER

The immunological approach to the treatment of human cancer. Europ. J. Cancer 3, 423 (1967)

36. NADLER, S. H. and G. E. MOORE

a) Autotransplantation of human cancer. J. Amer. med. Ass. 191, 117 (1965)

b) Clinical immunologic study of malignant disease. Response to tumor transplants and transfer of leukocytes. Ann. Surg. 164, 482 (1966)

37. OETTGEN, H. F., E. A. BOYSE, and L. J. OLD

Krebs und Immunologie. Krebsforschung und Krebsbekämpfung 6, 49 (1967)

38. OLD, L. J. and E. A. BOYSE

Prospects for immunotherapy of human cancer. Ann. intern. Med. 69, 393 (1968)

39. OLD, L. J., E. A. BOYSE, and F. LILLY

Formation of cytotoxic antibody against leukemias induced by Friend virus. Cancer Res. 23, 1063 (1963)

40. OLD, L. J., E. A. BOYSE, and E. STOCKERT

The G (Gross) leukemia antigen. Cancer Res. 25, 813 (1965)

41. OLD, L. J., E. A. BOYSE, D. A. CLARKE, and E. A. CARSWELL
Antigenic properties of chemically induced tumors. Ann.
N. Y. Acad. Sci. 101, 80 (1962)
42. OUCHTERLONY, Ø.
 - a) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy 2, 1 (1958)
 - b) dto. Progr. Allergy 6, 30 (1962)
 - c) Immunochemistry: Gel-diffusion-techniques. (Springer,
Berlin/ Heidelberg/ New York 1965)
43. PREHN, R. T. and J. M. MAIN
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. nat.
Cancer Inst. 18, 769 (1957)
44. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und H. W. HERBST
Tierexperimentelle Untersuchungen mit Tumor-Transferrin-
Komplexen. Med. exp. 19, 170 (1969)
45. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und E. LEHR
Tierexperimentelle Studien zur Frage einer Isosensibilisie-
rung mit Tumorproteinen. I. Mittl. Sensibilisierungs- und
gekreuzte Transplantationsversuche an ein und demselben
Tierstamm. Med. exp. 18, 86 (1968)
46. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und U. MUNDHENKE
Tierexperimentelle Studien zur Frage einer Isosensibilisie-
rung mit Tumorproteinen. II. Mittl. Austauschtransplantatio-
nen an Tieren verschiedener Zuchtstämme. Med. exp. 18, 95
(1968)
47. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ, H. WARNATZ und K. GÜNTHER
Serologische und immunologische Studien an tumortragenden
Ratten unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittl. I:
Yoshida-Tumoren (Für den Druck vorbereitet)

48. SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ, H. GÖTZ und M. ROHRWASSER
Immunologische Studien an Walker-Carcinom und Yoshida-Sarkom. Z. Krebsforsch. 70, 178 (1967)

49. SJÖGREN, H. O. and N. JONSSON
Resistance against isotransplantation of mouse tumors induced by Rous sarcoma virus. Exp. Cell. Res. 32, 618 (1963)

50. SJÖGREN, H. O., I. HELLSTRÖM, and G. KLEIN
Resistance of polyoma virus immunized mice to transplantation of established polyoma tumors. Exp. Cell. Res. 23, 204 (1961)

51. SOLOWEY, A. C. and F. T. RAPAPORT
Immunologic responses in cancer patients. Surg. Gynec. Obstet. 121, 756 (1965)

52. SOUTHAM, C. M.
Relationships of immunology to cancer: A review. Cancer Res. 20, 271 (1960)

53. WEIR, D. M.
Handbook of experimental immunology. (Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh 1967)

54. ZBAR, B., I. BERNSTEIN, T. TANAKA, and H. J. RAPP
Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumor cells and living *Mycobacterium bovis* (strain BCG). Science 170, 1217 (1970).

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Übernahme des Referates und die Überlassung des Themas der Arbeit herzlich danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Frau Priv.-Doz. Dr. H. Götz für ihre wertvollen Anregungen und bereitwilligen Unterstützungen bei den Experimenten und der literarischen Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 10. Dezember 1946 wurde ich als Sohn der verwitweten Fabrikarbeiterin Berta Dietel, geb. Baumgärtner, in Weißdorf (Ofr.), Kreis Münchberg, geboren.

Ich besuchte von September 1953 bis Juli 1957 die Volksschule in Weißdorf und trat nach erfolgreicher Aufnahmeprüfung im September 1957 in die damalige Oberrealschule Münchberg ein, an der ich neun Jahre, bis Juli 1966, verblieb und im Juni 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Direktorat der Schule wurde ich für das Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz vorgeschlagen; die notwendige Prüfung hierzu bestand ich im Juli 1966 am Jean-Paul-Gymnasium in Hof (Saale).

Nach erteilter Zulassung durch die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, begann ich im Wintersemester 1966/67 dort mit dem Studium der Medizin, in dessen vorklinischem Verlauf ich im Sommersemester 1967 das Vorphysikum und im Wintersemester 1968/69 das Physikum ablegte. Nach dem Wintersemester 1971/72 begann ich mit dem Staatsexamen, welches ich am 21. Juli 1972 bestand.

Wlfrid Baumgärtner

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990